

III Congresso Luso-Brasileiro de Pneumologia

Textos

Lina Carvalho*

Carcinoma do pulmão. Interesse da biologia molecular no diagnóstico e prognóstico

Lung cancer. Molecular biology in diagnosis and prognosis

Resumo

A patologia molecular no carcinoma bronco-pulmonar, nas lesões pré-neoplásicas e nas hiperplasias pode ser estudada pela aplicação dos métodos gerais do conhecimento biológico, em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina e também em células. A distinção entre o carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma pode ser baseada em alterações genéticas mas ainda com as sobreposições concorrentes. O cromossoma 7 escolhido como marcador de estudo de alterações genéticas nos carcinomas e nas lesões pré-neoplásicas pode ser a primeira abordagem, embora ainda não estejam esclarecidos os critérios de distinção nestas últimas. A expressão genética alterada tem implicações no potencial metastático dos carcinomas pulmonares.

Palavras-chave: Pulmão, carcinoma, biologia molecular.

Abstract

Molecular pathology in lung cancer, pre-neoplastic lesions and hyperplasias, may be studied by applying diagnostic methods available in biology, using cells as well as formalin-fixed-paraffin-embedded tissues. Distinction between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma can be made through different patterns of genetic alterations but still with a number of similarities. Chromosome 7 is a target of first choice to evaluate genetic modifications in either carcinomas and premalignant lesions although the latter have not yet been completely clarified in lung carcinomas. Survival and metastasis potentiality can be predicted also by determination of genes expression.

Key words: Lung, carcinoma, molecular biology.

Professora de Anatomia Patológica. Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra
3000 Coimbra – Portugal
lcavalho@huc.min-saude.pt

1. Introdução

A prática clínica moderna está actualmente dependente da introdução dos conhecimentos adquiridos com os métodos e técnicas de biologia molecular na rotina de diagnóstico e prognóstico para o desenvolvimento da qualidade dos actos médicos.

A carcinogénese bronco-pulmonar é entendida como multifactorial, decorrente de agentes iniciadores que provocam alterações genéticas. O reconhecimento de lesões pré-neoplásicas multifocais permite entender a evolução da clonalidade celular no campo da carcinogénese, dependente das alterações implicadas na progressão, invasão e metastização e cujo estudo e conhecimento molecular são pertinentes¹.

Para os estudos da biologia do carcinoma e lesões pré-neoplásicas do brônquio e parênquima pulmonar, há necessidade de recorrer a inúmeras técnicas aplicadas em tecidos frescos, incluídos em parafina, células... como sejam: imuno-histoquímica, reacção em cadeia da polimerase do ADN, hibridização *in situ* com e sem imunofluorescência, citogenética de interfase e hibridização genética combinada, citometria de fluxo e estática, microdissecção *laser* e finalmente a técnica de *microarrays*, útil pela possibilidade de estudar muitas lesões do mesmo doente ou de doentes diferentes, em simultâneo, bem como avaliar múltiplas alterações genéticas^{2,3}.

Actualmente, já estão reconhecidas alterações genéticas nas lesões pré-neoplásicas e nos vários tipos histológicos do carcinoma broncopulmonar dependentes de inactivação de genes supressores e alterações em oncogenes. As vias da apoptose pelo gene p53 e Rb (retinoblastoma) são as mais estudadas, sabendo-se que são determinantes na

evolução das lesões pré-neoplásicas, como a metaplasia epidermóide, associadas a perda de heterozigosidade dos braços curto e longo dos cromossomas 3 e 5, respectivamente¹.

Na hiperplasia adenomatosa atípica estão determinadas mutações no gene RAS e também na via do gene supressor Wnt (tumor de Wilms), onde está incluído o gene APC (polipose adenomatose cólica). A estas alterações associam-se outras da família do gene MYC que contribuem para a progressão do carcinoma⁴.

O grupo dos tumores neuroendócrinos é heterogéneo e assim também os conhecimentos genéticos sobre os mesmos: 65% dos carcinóides atípicos apresentam mutações e ou perda de heterozigosidade do gene MEN1 (neoplasia endócrina múltipla)¹.

Os efeitos dos componentes múltiplos do tabaco na carcinogénese do cancro pulmonar são elucidativos dos níveis de acção possível em todas as fases do ciclo celular e também na proteómica e relações intercelulares dependentes das alterações genéticas deles decorrentes. São da maior importância as consequências dos polimorfismos enzimáticos individuais, uma vez mais com ênfase nos genes de reparação do ADN dependentes do gene P53¹.

No momento actual, os efeitos precoces da carcinogénese dependente dos agentes do tabaco estão determinados a dois níveis: no pulmão com morfologia normal e no carcinoma broncopulmonar, sem relação precisa com a carga tabágica.

A deleção parcial do gene FHIT (*fragile histidine triad*) no braço curto (p) do cromossoma 3 e a transversão das bases G para T como mutação no gene TP53 no cromossoma 17p13 (braço curto do cromossoma 17, na região 1 e banda 3), são

alterações detectáveis precocemente. Mutações nos genes KRAS e GST M1 (*Glutathione-S-Transferase enzyme*) indicam alto risco para progressão do carcinoma broncopulmonar⁵.

Diagnóstico

Naturalmente não há dificuldade de diagnóstico diferencial entre os vários padrões morfológicos do carcinoma broncopulmonar. Embora com alguma sobreposição nas alterações moleculares conhecidas, há desvios genéticos predominantes nos vários tipos.

Carcinoma epidermóide – A perda alélica de pequenas áreas do cromossoma 3p indica a progressão da metaplasia epidermóide para carcinoma epidermóide. Esta e outras deleções associam-se ao potencial metastático posteriormente, quando em presença do carcinoma epidermóide invasivo: 3p12-p14; 4p15-p16; 8p22-p23; a expressão aumentada / amplificada de 1q21-q25, 8q11-q25, 10q e 21q, também se associam a mau prognóstico⁶.

Adenocarcinoma – Ainda não foi determinada a importância dos padrões histológicos dos adenocarcinomas pulmonares na progressão e metastização, na dependência das alterações cromossómicas ou do ciclo celular já conhecidas em geral, não sendo habitualmente feita referência à morfologia. São conhecidas mutações pontuais do gene KRAS, em cerca de 30% dos adenocarcinomas, nos codões 12, 13 e 61. Também são características dos adenocarcinomas pulmonares, expressão aumentada do gene PTEN/KIP1/p27 (10q), relacionado com progressão lenta, ao invés da expressão

amplificada dos genes HER2/neu e do COX-2⁶.

Tanto nos carcinomas epidermóides como nos adenocarcinomas está identificada instabilidade cromossómica, com ganhos nos cromossomas 1q, 5p (gene hTERT) e 8q (MYC) e perdas no cromossoma 17p (TP53). A amplificação do c-myc associa-se a metastização ganglionar / linfática⁶.

Carcinoma de células pequenas – Verifica-se deleção no cromossoma 3p em 100% dos casos, com formação de isocromossomas, e há ganhos de ADN nos cromossomas 3q, 5p, 6p, 8q, 19q e 20q; a alteração 17q24-q25 está relacionada com a metastização cerebral.

Entende-se o mau prognóstico do carcinoma de células pequenas devido à amplificação do gene MYC (no cromossoma 8) e à inactivação de genes supressores da via RB e mutações do P53, pelos componentes do tabaco. Também a metilação da caspase e sobreexpressão do gene E2F1, genes anti-apoptóticos, contribui para a progressão e metastização rápidas¹.

Carcinóide típico e atípico – A mutação do gene MEN1 leva à ausência da proteína menin, geralmente associada a perda alélica no cromossoma 11p13 em 50 a 70% dos carcinóides atípicos que também apresentam perda de heterozigosidade (LOH) nos cromossomas 9p21, 3p, 13q e 17p².

Lesões pré-neoplásicas – ou **Lesões epiteliais pré-invasivas**, assim definidas pela Organização Mundial de Saúde no livro *Patologia e Genética dos Tumores do Pulmão, Pleura, Timo e Mediastino*, editado em Outubro de 2004, compreendem a displasia epidermóide

e carcinoma *in situ*, hiperplasia adenomatosa atípica e hiperplasia de células neuroendócrinas pulmonar idiopática difusa.

As lesões mais estudadas são as hiperplasias de células caliciformes, de células basais e não específicas, conjuntamente com a metaplasia epidermóide e displasia epidermóide. Os estudos podem ser feitos em produtos de biópsia e na citologia brônquica, aplicando técnicas de PCR-RT e de FISH ou CGH. Aqueles produtos podem ser avaliados depois da inclusão em parafina (e em esfregaços celulares) e colocados em interfase por digestão enzimática para estudo celular individualizado posterior.

A trisomia 7 determina risco muito aumentado de progressão para carcinoma em lesões hiperplásicas porque se associa a sobre-expressão dos seguintes genes: c-met, factor A de crescimento plaquetar, inibidor tipo 1 do activador do plasminogénio e EGFR. Também as alterações de 18q21.3 indicam defeitos nos genes Maspín, recentemente identificados e alterados nas lesões pré-neoplásicas⁷.

Nas células brônquicas e células do plasma podem ser precocemente identificadas alterações do gene TP53, como forma de diagnóstico precoce.

Prognóstico

Assim como no diagnóstico, também para o prognóstico estão determinados parâmetros que indicam a gravidade do comportamento do **carcinoma de células pequenas**. A transição guanina para tirosina na sequência do P53 em fumadores e no género feminino, o aumento da regulação do gene Bcl-2, do c-Kit e da telomerase, bem como a activação da função autócrina de peptídeos com efeitos seme-

lhantes aos da bombesina e expressão de factores de crescimento vascular caracterizam a progressão, crescimento e metastização rápida desta neoplasia⁸.

O **carcinoma neuroendócrino de células grandes** tem mau prognóstico, como o carcinoma de células pequenas, e apresenta perdas alélicas semelhantes que perturbam as vias da apoptose: 3p21, FHIT, 3p22-24, 3q21, 3p21 e a via do gene RB.

O **carcinoma epidermóide** apresenta igualmente mau prognóstico quando também é portador de perdas de segmentos alélicos grandes ou pequenos em 3p. Por outro lado, a aquisição de cópias das regiões 2p13-q11.2, 3q25-q29, 6p21.2-p12, 9q13-q34 e 12p também traduz mau prognóstico.

No grande grupo dos **adenocarcinomas** foram determinadas alterações que definem a diminuição da sobrevivência dos doentes: mutações pontuais do oncogene k-ras, sobre-expressão da p185 – proteína do oncogene c-erb B2 e expressão de marcadores neuroendócrinos transcritos pelo mRNA, como sejam a descarboxilase aromática, ASH-1 e o peptídeo insulina-associado. Estas alterações neuroendócrinas manterão acesas as dúvidas classicamente levantadas pela expressão de marcadores neuroendócrinos revelados por imuno-histoquímica nos adenocarcinomas, esperando-se que a patologia molecular esclareça a sua utilidade para benefício do doente, contribuindo para a definição de comportamentos terapêuticos⁴. A sobre-expressão do cromossoma 1q, com ganho centromérico, relaciona-se com a disseminação hematogénica e metastização nos adenocarcinomas pulmonares.

Embora não tenha sido feita exploração das

implicações terapêuticas da patologia molecular do carcinoma broncopulmonar porque ainda não há padrões definitivamente aceites, devido ao facto de os estudos publicados resultarem de trabalhos realizados em linhas celulares preferencialmente, a determinação de mutações no gene do EGFR nos adenocarcinomas permite a administração do fármaco *gefitinib* que inibe a sinalização do EGFR⁹.

Conclusões

- A patologia molecular afirma-se como a área de investigação científica no presente e o alargamento da sua aplicação prevista no futuro próximo é a forma de entender as lesões pré-neoplásicas e a biologia do carcinoma broncopulmonar.
- O material dos arquivos dos Serviços de Anatomia Patológica, incluído em parafina, contribuirá para aquele conhecimento, porque permite, obtenção de resultados fiáveis com acumulação de conhecimentos.
- No grupo dos adenocarcinomas, alterações nos genes c-k-ras, p53 e c-erb B2 relacionam-se com mau prognóstico e poderão orientar a terapêutica.
- Nos carcinomas epidermóides: 9p LOH em estádios precoces, determina mau prognóstico.
- Nas lesões pré-neoplásicas e hiperplasias podem ser identificadas alterações do gene TP53 e no cromossoma 7 precocemente.
- *Microarrays*: citogenética/quimiossensibilidade ?? a determinar a médio prazo, devido ao elevado custo.

Bibliografia

1. Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart – pathology and genetics. WHO Classification of Tumours 2004, IARC Press, Lyon.
2. Crocker J, Murray PG: Molecular Biology in Cellular Pathology 2003, Wiley, West Sussex.
3. O'Leary TJ: Advanced Diagnostic Methods in Pathology 2003, Saunders, New York.
4. Beer D, Kardias S, Huang C, Giordano T, Levin A, Misk D, Lin L, Chen G, Gharib T, Thomas D, Lizyness M, Kuick R, Haysaka S, Taylor J, Iannettoni M, Orringer M, Hanash S: Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nature Medicine* 2002; 8(8): 816-824.
5. Zojer N, Dekan G, Ackerman J, Fiegl M, Kaufmann H, Drach J, Huber H: Aneuploidy of chromosome 7 can be detected in invasive lung cancer and associated premalignant lesions of the lung by fluorescence in situ hybridisation. *Lung Cancer* 2000; 28: 225-235.
6. Sy SM-H, Wong N, Lee TW, Tse G, Mok TS-K, Fan B, Pang E, Johnson PJ, Yim A: Distinct patterns of genetic alterations in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *European Journal of Cancer* 2004; 40: 1082-1094.
7. Smith S, Watson S, Ratschiller D, Gugger M, Betticher D, Heighway J: Maspin – the most commonly-expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer – is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions. *Oncogene* 2003; 22: 8677-8687.
8. Bangur C, Switzer A, Fan L, Marton M, Meyer M, Wang T: Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene* 2002; 21: 3814-3825.
9. Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, Tsunoda T, Okada K, Kakiuchi S, Zembutsu H, Furukawa Y, Kawamura M, Koichi K, Imai K, Nakamura Y: Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene* 2003; 22: 2192-2205.